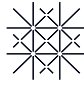
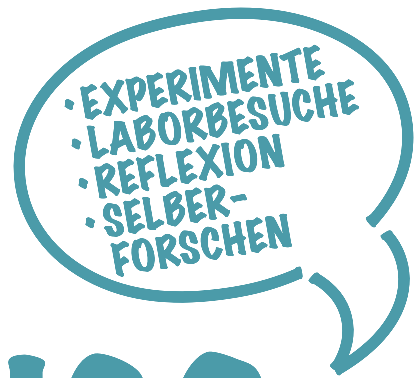


ETH zürich




Zurich-Basel Plant Science Center

FORSCHUNGS-HEFT #8

Genome Editing

Cas9

sgRNA



1 Klimawandel
2 3D-Mikroskopie
3 Moderne Pflanzenzucht
4 Metabolismus
5 Biokommunikation
6 Adaptive Evolution
7 Symbiose
8 Genome Editing

VISIT…

LANZAROTE
Caliente.com

Das Ziel von Genome Editing in der Pflanzenzucht sind Pflanzen mit verbesserten Merkmalen. Dieser Workshop wird dir einen Einblick ins Genome Editing mittels der Genschere CRISPR/Cas9[Glossar] geben. Am Beispiel der Tomate (*Solanum lycopersicum*) und einem Online-Tool wirst du selber künstliche RNA-Sequenzen (sgRNA[Glossar]) identifizieren, die für die Cas9-Reaktion eingesetzt werden können. Das Einführen des Cas9/sgRNA-Systems in die Pflanzenzellen wird thematisiert, ebenso die Analyse der veränderten Pflanzen. Anhand von Sequenzvergleichen wirst du analysieren, was die CRISPR/Cas9-Methode in unserem Beispiel bewirkt hat. Zum Abschluss wird die gesellschaftliche Relevanz der vorgestellten Methode in der Pflanzenzucht diskutiert.

Alle Forschenden haben ein Notizbuch – Das ist dein FORSCHUNGSHEFT für den Workshop Genome Editing. Du kannst es benutzen, um Notizen zu machen, zu zeichnen oder einfach nur, um hineinzukritzeln. Wir empfehlen, dass du deine Beobachtungen und Fragen notierst. Es ist dein Arbeitsbuch. Wir laden dich ein, mitzudenken und kreativ zu sein. !

Weitere Materialien stehen für Lehrpersonen zum downloaden zur Verfügung: www.plantsciences.uzh.ch/de/outreach/discovery.html

VORWISSEN

- Aufbau der eukaryotischen Zelle
- Grundlagen der molekularen Genetik
- Transkription, Translation
- Protein-Biosynthese
- Mutationen (Insertion, Deletion, Leserasterverschiebung)
- Vektoren/Plasmide
- Genome Editing
- CRISPR/Cas9

Die Kulturtomate (*S. lycopersicum*)

Geschichte

Die Tomate stammt aus der Region der Anden, im westlichen Südamerika. Wann und wie sie genau domestiziert wurde, ist unbekannt. Die spanischen Eroberer fanden in Mexiko eine kultivierte Form der Pflanze bereits vor und führten sie im 16. Jahrhundert in Europa ein. Anfänglich nur als Zierpflanze akzeptiert, wurde sie ab dem 18. Jahrhundert intensiver kultiviert und fand grosse Verbreitung als Lebensmittel. Seit dem 20. Jahrhundert wächst die Anzahl an morphologisch verschiedenen Sorten[Glossar] stetig an. Alle Sorten stammen von einer einzigen Art ab: *Solanum lycopersicum*.

Die Sorten, deren Anzahl geschätzt an die Tausende reicht, unterscheiden sich in Grösse (z. B. Cherrytomate, Fleischtomate), Farbe (Gelb, Orange, Rot) und Wuchstyp (Wachstum limitiert oder nicht). Ausserdem sind verschiedene Sorten an verschiedene Anbaubedingungen angepasst (Höhe, Temperatur, Feuchtigkeit) und gegen bestimmte Schädlinge resistent. Dazu gehören Oomyzeten (Phytophthora), Pilze (Echter Mehltau), Viren (Geminivirus, Tomatenmosaikvirus) oder Insekten. Neben den kommerziell weitverbreiteten Hybriden[Glossar] werden lokal auch alte Tomatensorten angebaut. Eine kleine Auswahl an Sorten mit Foto gibt es z. B. unter: www.stekovics.at/pflanzen/paradeiser

Genetische Vielfalt und Tomatenzucht

Im 16. Jahrhundert gelangten nur wenige Genotypen nach Europa und wurden dort auf bestimmte Merkmale weitergezüchtet. Dadurch verarmte die Tomate zusehends genetisch (1). Erst ab ca. 1940 wurde die eingeführte und weitergezüchtete Kultursorte wieder mit Wildarten gekreuzt, da letztere häufig Resistenzgene gegen die mehr als 200 bekannten Tomatenschädlinge besitzen. Es gibt auch Bestrebungen Tomaten zu züchten, die besser an ihre Anbauregionen ausserhalb ihres Ursprungsgebiets in den Subtropen angepasst sind, z. B. salztolerante Tomaten, die mit Brackwasser statt mit Süsswasser bewässert werden können (2). In der Schweiz werden im Rahmen des «Nationalen Aktionsplans zur Erhaltung und nachhaltigen Nutzung der pflanzengenetischen Ressourcen für Ernährung und Landwirtschaft» 58 alte Kulturtomatensorten von verschiedenen Erhaltungsorganisationen erhalten. Diese Sorten sind aktuell nicht auf dem Markt, ihr genetisches Potential soll aber auch für die Zukunft verfügbar bleiben (3).



Abb. 1

Der grossen morphologischen Vielfalt von Tomatensorten begegnet man vor allem auf Wochenmärkten.
Bild: Wiikimedia Commons/joergens.mi

Die Wildart, von der die Kulturtomate stammt



Abb. 2

***S. pimpinellifolium*, klein und samenreich. Diese Wildart gilt als Ausgangsform der Domestizierung der Tomate.**
Bild: Scott Peacock, C. M. Rick Tomato Genetics Resource Center

Molekulare Genetik

Die Entwicklung von DNA-Analysemethoden eröffnete neue Möglichkeiten in der Pflanzenzucht. Die sogenannte Marker-gestützte Selektion (MAS) beruht darauf, dass phänotypische Merkmale bestimmten DNA-Sequenzen zugeordnet werden können. Dies vereinfacht die Selektion geeigneter Pflanzen, da schon in einem sehr frühen Wachstumsstadium die Pflanze mit den gewünschten Eigenschaften identifiziert werden kann. Die Methode wird auch in der Tomatenzucht vermehrt eingesetzt, wo Dutzende von Genen mit bestimmten Merkmalen und Markern assoziiert wurden.

Transgene Tomaten

Die erste transgene Tomate kam 1994 auf den Markt (4). Sie wurde von der kalifornischen Firma Calgene entwickelt. Das Ziel war, die Früchte im reifen Zustand ernten zu können.

Tomaten werden häufig unreif geerntet, damit die Frucht nicht beschädigt wird, und mit Ethylengas zum Reifen gebracht. Die neue Tomate sollte am Strauch reifen und mehr Aromastoffe bilden können. Die Nachfrage nach der neuen Tomate war gross, aufgrund der hohen Kosten für Produktion und Vertrieb aber hat sich die neue Sorte nicht durchgesetzt.

Genomik und Tomate

Die rasante Entwicklung von Sequenziertechnologien hat ein neues Forschungsgebiet hervorgebracht. In der Genomik wird das gesamte Genom eines Organismus, z. B. einer Pflanze analysiert. Das beinhaltet die Sequenzierung der kompletten DNA, sowie die Analyse der Struktur, Funktion und Evolution des Genoms sowie das Untersuchen von Wechselwirkungen zwischen den Genen und den Proteinen oder RNA.

Eine 100%ige Sequenzierung ist bei Pflanzengenomen häufig sehr schwierig, aufgrund langer sich wiederholender DNA-Abschnitte, Duplizierungen von Gensequenzen oder auch der Schwierigkeit, qualitativ hochwertige DNA aus Pflanzenmaterial zu extrahieren.

Genomische Analysen sind grosse, zeitaufwendige Projekte und generieren riesige Mengen an Daten, die mithilfe von eigens programmierter Software ausgewertet werden. Eine Gruppe von über 300 Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern aus vierzehn Ländern sequenzierte etwa 85% des Erbguts einer bestimmten Sorte der Kulturtomate (*Solanum lycopersicum* Heinz 1706) (5). Über 30'000 Gene sowie ihre Position im Genom wurden identifiziert. Bei ca. 2'300 Genen ist inzwischen die Funktion bekannt. Durch Vergleiche mit bekannten Genomen anderer Arten können Hinweise auf die Funktion weiterer Gene gesammelt werden.

Eine Art, viele Sorten



Abb. 3

Fruchtsorten von *S. lycopersicum*
«green flesh» (gf,r), «yellow flesh» (r,y), «apricot» (at,u), «Delta» (Del), «Beta-carotene» (B), «tangerine/virescent» (t^v), und «uniform ripening» (t,u).
Bild: C.M. Jones, C. M. Rick Tomato Genetics Resource Center



Abb. 4

Frucht der Sorte «Beta-carotene/ crimson» (B^c)
Bild: C.M. Jones, C. M. Rick Tomato Genetics Resource Center

Genome Editing in der Tomate

Ist der genetische Hintergrund einer Sorte bekannt, so kann dies für eine gezielte Zucht eingesetzt werden. Forschende könnten z. B. für den Geschmack verantwortliche Gene identifizieren. Das würde Züchtern die Möglichkeit geben, ausgewählte Allele in eine etablierte, aber wenig geschmackvolle, Sorte einzuführen und so eine neue Sorte mit mehr Geschmack zu erzeugen. Dies könnte über konventionelle Kreuzung und Selektion geschehen, was allerdings mehrere Jahre in Anspruch nehmen würde. Mit CRISPR/Cas9 Genome Editing dagegen könnte das Ziel schneller erreicht werden.

Die Effizienz dieser Methode wird in einer Studie deutlich (6), bei der Forschende sechs Tomatengene aufs Mal gezielt modifiziert haben. Innerhalb nur einer Generation züchteten sie aus einer Wildtomatenart eine «Kultursorte» mit grösseren und zahlreicheren Früchten, die sogar mehr Lycopin enthalten als konventionelle Kulturtomaten.

Dies war natürlich nur möglich, weil die für die erwünschten Merkmale verantwortlichen Gene in der Kulturtomate bekannt waren und in der Wildpflanze gezielt verändert werden konnten. Die Züchtung mittels Genome Editing stützt sich also auf die Erkenntnisse und Leistungen der klassischen Pflanzenzucht.

Wie funktioniert die CRISPR/Cas9-Methode?

Mit dem CRISPR/Cas9-System wehren sich Bakterien gegen Viren. Für die Anwendung im Labor wurde das System auf zwei Komponenten reduziert: Das Cas9-Protein und die Single Guide RNA (sgRNA). Cas9 ist eine Nuklease, d. h. ein Protein, das DNA schneiden kann. Die sgRNA besteht aus dem Protospacer, einer 17–21 Basenpaare langen Sequenz, die komplementär zur Zielsequenz im Genom ist, sowie aus einer Haarnadel-bildenden Sequenz, die mit Cas9 assoziiert. Cas9 bindet an bestimmten Stellen in der DNA, den sogenannten PAM (protospacer adjacent motif); dabei handelt es sich um eine Sequenz von den 3 Nukleotiden NGG, wobei N jedes Nukleotid sein kann. PAM kommen im Genom sehr häufig vor, deshalb findet sich meist eins auch in der Nähe der Zielsequenz. Cas9 öffnet die Doppelhelix stromaufwärts von PAM. Passen die sgRNA und die DNA perfekt aufeinander, binden sie aneinander mittels komplementärer Basenpaarung. Dies bewirkt eine Konformationsänderung im Cas9-Protein (seine 3D-Struktur ändert sich) und aktiviert seine Nuklease-Funktion. Daraufhin schneidet Cas9 beide DNA-Stränge stromaufwärts von PAM und ein Doppelstrangbruch entsteht.

Zellen besitzen mehrere Reparatursysteme, um DNA-Schäden, die regelmässig auch auf natürliche Weise (z. B. durch Sonnenstrahlung, Chemikalien, Fehler bei der Replikation) entstehen, zu reparieren. Beim Non-Homologous End Joining (NHEJ; Deutsch: nicht-homologe Endverknüpfung) werden die losen DNA-Enden eines Doppelstrangbruchs wieder zusammengefügt. Dieser Mechanismus ist oft fehlerhaft und es können dabei Deletionen oder Insertionen von Nukleotiden entstehen (man spricht zusammengefasst von «Indels»). Forschende nutzen diesen natürlichen fehlerhaften Prozess, um Gene zu modifizieren. So können sie ihre Funktion studieren oder – im Fall der Pflanzenzucht – Pflanzen mit verbesserten Merkmalen züchten.

Tipp

In dieser interaktiven Animation siehst du wie CRISPR/Cas9 funktioniert:
www.hhmi.org/biointeractive/crispr-cas-9-mechanism-applications

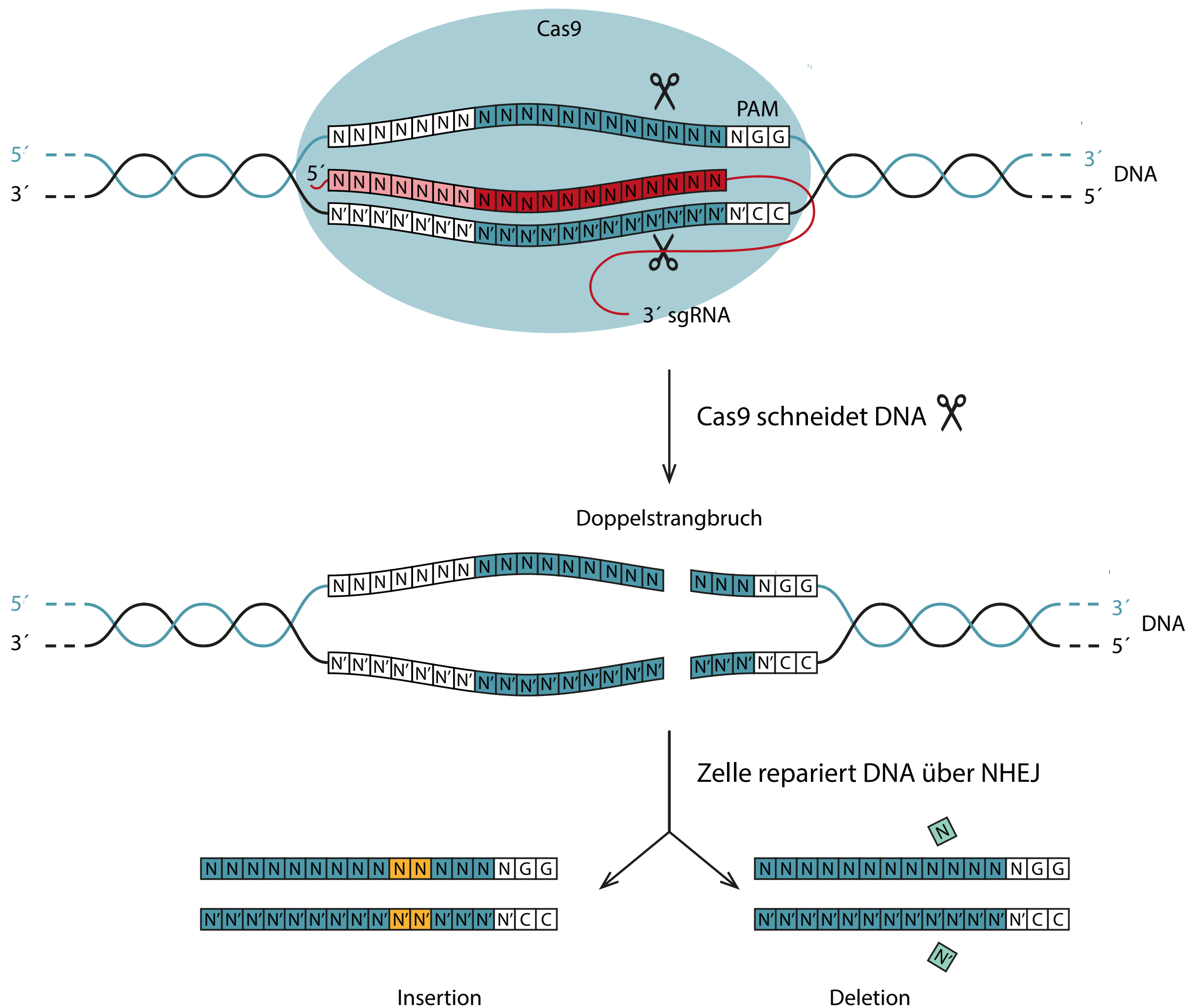


Abb. 5
Genome Editing mittels CRISPR/Cas9

Cas9 erkennt PAM und öffnet die DNA stromaufwärts von PAM; die komplementäre sgRNA bindet an die DNA; Cas9 schneidet beide DNA-Stränge, ein Doppelstrangbruch entsteht. Die zelleigenen Reparatursysteme knüpfen die DNA-Enden wieder zusammen (NHEJ), wobei Insertionen oder Deletionen häufig sind.
Bild: PSC

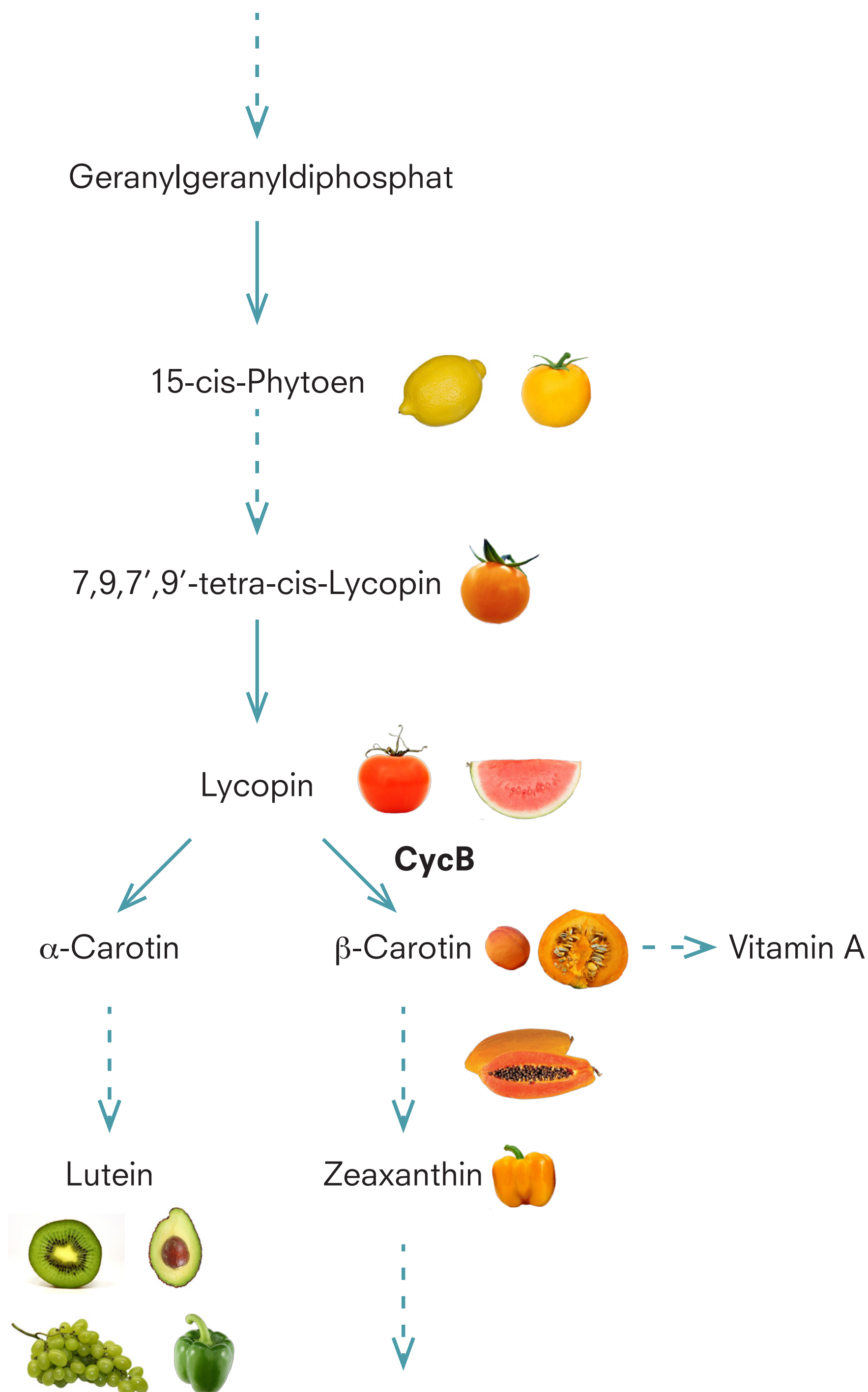


Abb. 6

Carotinoid-Biosynthese

Vereinfachte Darstellung der Carotinoid-Biosynthese. Die Früchte stehen im Pathway auf der Höhe des vorherrschenden Carotinoids, das für ihre Färbung verantwortlich ist. Lycopin ist für die rote Farbe verantwortlich (CycB: Lycopin-β-Cyclase).

Fotos: Pixabay

ÜBERSICHT
WAS WIRST DU HEUTE MACHEN?

Mittels Genome Editing können Pflanzenzüchterinnen und Pflanzenzüchter verschiedene Gene verändern, um bestimmte Pflanzeneigenschaften in einer relativ kurzen Zeit zu verbessern oder, um die Rolle verschiedener Gene bei der Ausbildung dieser Eigenschaften besser zu verstehen. Dabei kann es sich um die Grösse der Früchte handeln oder um ihre Form, Farbe oder Anzahl. Auch der Geschmack sowie die Resistenz der Pflanze gegenüber Schädlingen oder widrigen Bedingungen wie Trockenheit sind Gegenstand der Pflanzenforschung und -züchtung.

In unserem Beispiel wirst du dich mit der gezielten Veränderung eines Gens beschäftigen, welches den Nährwert der Tomate beeinflusst.

Der Nährwert einer Pflanze wird von vielen verschiedenen Genen beeinflusst. In der Tomate beruht er hauptsächlich auf der Menge an β-Carotin und Lycopin in der Frucht. Carotinoide wie Lycopin absorbieren Licht für die Photosynthese und schützen photosynthetische Organismen vor Oxidationsschäden. Lycopin gibt den Früchten ihre leuchtende rote Farbe. Verglichen mit Wildarten (z. B. *Solanum pimpinellifolium*), enthalten die auf dem Markt erhältlichen Tomatensorten weniger Lycopin.

Die Lycopin-β-Cyclase (CycB) ist an der Umwandlung von Lycopin zu β-Carotin beteiligt (Abb. 6). Wird das Gen der Lycopin-β-Cyclase modifiziert, kann diese Umwandlung nicht stattfinden und die Menge an Lycopin in der Frucht nimmt zu (6).

Heute wirst du lernen, wie man Genome Editing anwendet, um ein Gen zu verändern, welches den Lycopin-Gehalt in der Tomate erhöht.

ARBEITSSCHRITTE BEIM GENOME EDITING

1. GENOMIK
Wie stellst du sicher, dass dein Genome Editing-Werkzeug nur das ausgewählte Gen modifiziert und keine anderen?

PROTOKOLL
Auswahl des Genome Editing-Werkzeugs

2. EINFÜHREN
Wie wird das Genome Editing-Werkzeug in die Pflanze eingeführt?

WISSENSTEXT
Einführen des Genome Editing-Werkzeugs in die Pflanze

3. NACHWEIS
Wie wirst du erkennen, ob das Gen erfolgreich modifiziert wurde?

AUFGABE
Nachweis der Genommodifizierung

ÜBERSICHT
WAS WIRST DU HEUTE MACHEN?

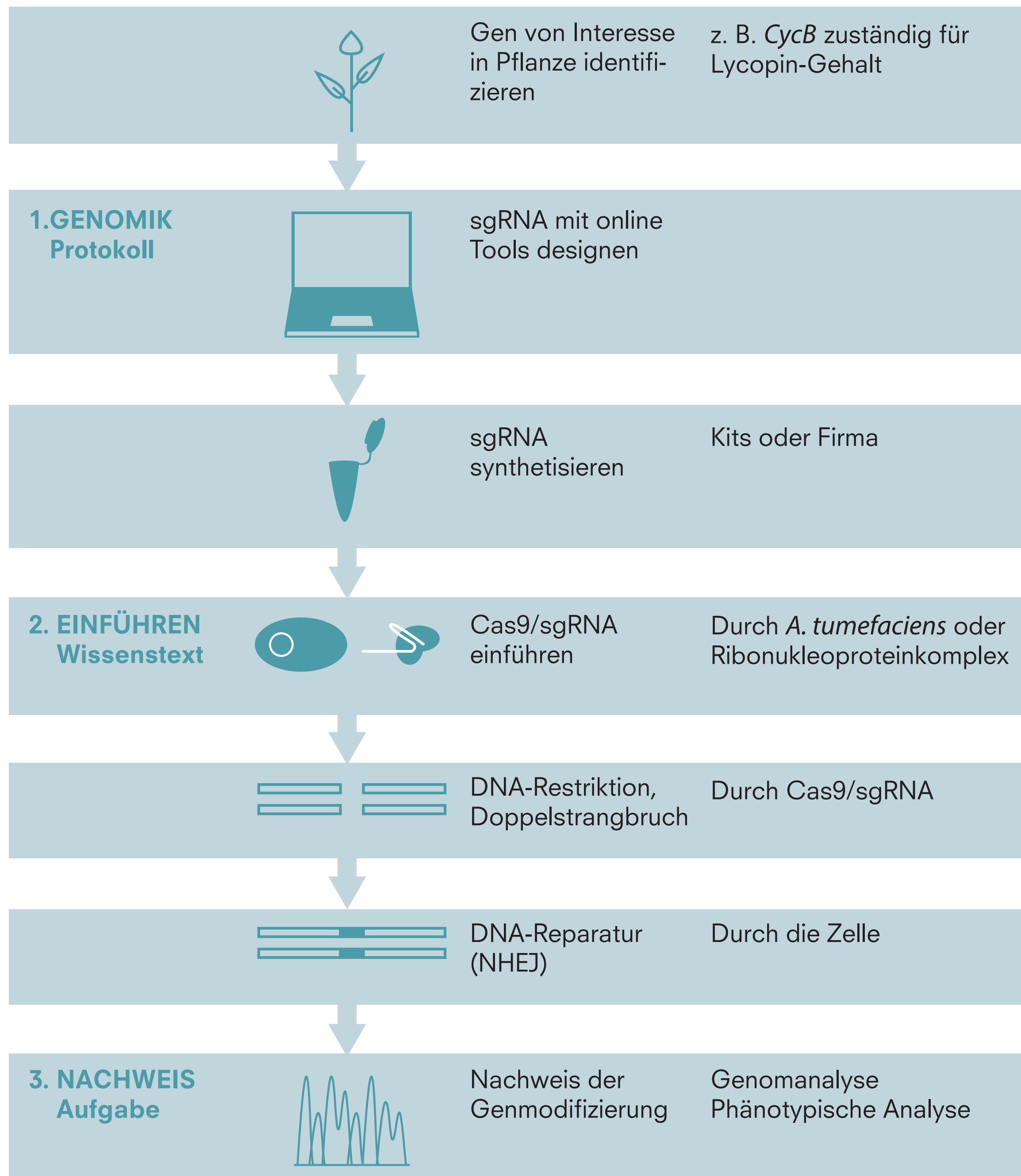


Abb. 7
Überblick über die Arbeitsschritte beim Genome Editing in einer Pflanze (vereinfacht) Bild: PSC

PROTOKOLL
Auswahl des Genome Editing-Werkzeugs



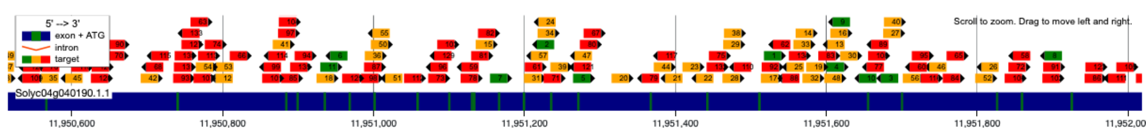
Für diesen Versuch wirst du eine Computersoftware verwenden, um verschiedene sgRNAs zu identifizieren und zu analysieren. Diese brauchst du, um das ausgewählte Gen (*CycB*) zu modifizieren. Für diesen Zweck gibt es verschiedene Computerprogramme, du wirst heute mit CHOPCHOP (7, 8) arbeiten.

SOFTWARE KENNENLERNEN

1. Öffne die CHOPCHOP Software (http://chopchop.cbu.uib.no).
2. Füge die Referenznummer für *CycB* ins Feld "Target" ein (Referenznummer: Solyc04g040190).
3. Wähle "Solanum lycopersicum" im Feld "In" aus.
4. Wähle "CRISPR/Cas9" im Feld "Using".
5. Verwende die vorgegebenen Einstellungen.
6. Klicke auf "Find Target Sites!"

Das Ergebnis sollte so aussehen:

Solyc04g040190



Download results: Please select one

View in UCSC genome brows

Rank	Target sequence	Genomic location	Strand	GC content (%)	Self-complementarity	MM0	MM1	MM2	MM3	Efficiency
1	CATTGTCTAATACCAATGGGTGG	SL3.0ch04:11951519	+	40	0	0	0	0	0	72.59
2	CATAAGCAACTTGATACCCGGGG	SL3.0ch04:11951218	-	45	0	0	0	0	0	71.94
3	AATGACTTCTTTCAGAACCGAGG	SL3.0ch04:11951674	-	40	0	0	0	0	0	70.55
4	TCCATCCACCGGTTATATGGTGG	SL3.0ch04:11951602	+	50	1	0	0	0	0	60.39
5	CCCCTTTGATGTAAACAAGATGG	SL3.0ch04:11951266	+	40	0	0	0	0	0	56.50
6	GTACACTGCTGCACCAGACCAGG	SL3.0ch04:11950944	-	60	0	0	0	0	0	54.89
7	ACGGTGGTGCTCGATGCAACTGG	SL3.0ch04:11951156	+	60	1	0	0	0	0	48.13
8	AGCCCAAAAACTATGAGTTCAGG	SL3.0ch04:11951891	-	40	0	0	0	0	0	45.21
9	TGTCCTTGCCACCATATAACCGG	SL3.0ch04:11951610	-	45	0	0	0	0	0	43.78
10	ATTATGGCATTGGCAACAACAGG	SL3.0ch04:11951645	-	40	0	0	0	0	0	42.45

Abb. 8
Screenshot von CHOPCHOP
Erstellt 8. Mai 2019. Abweichungen möglich

FRAGEN

Auswahl des Genome Editing-Werkzeugs



Eine grosse Anzahl an möglichen sgRNAs wurden identifiziert. Verwende die Informationen aus der Software, um die sgRNAs zu analysieren und die folgenden Fragen zu beantworten.

1. sgRNAs werden als kleine, farbige Pfeile dargestellt. Was, denkst du, stellt die Richtung des Pfeiles dar?

2. Vergleiche eine "grüne" und eine "rote" sgRNA (Klicke auf sie, um mehr Informationen zu sehen). Worin unterscheiden sie sich? Welche würdest du verwenden, um das ausgewählte Gen zu modifizieren und warum?

3. Was sind "Off-Targets"?

4. Kann ein Gen, welches geschnitten wurde, mit Hilfe der gleichen sgRNA nochmal geschnitten werden?

FRAGEN (optional)
Auswahl des Genome Editing-Werkzeugs



Eine der verwendeten Komponenten im Genome Editing ist die sgRNA.

1. Für was steht die Abkürzung sgRNA?

2. Was ist die Funktion der sgRNA?

3. Warum ist das Design der sgRNA so wichtig?

WISSEN



Einführen des Genome Editing-Werkzeugs in die Pflanze

Die Software hat die besten sgRNAs designt. Die Forschenden synthetisieren nun die ausgewählten sgRNAs im Labor oder lassen sie von einer Firma synthetisieren.

Der nächste Schritt ist das Genome Editing-Werkzeug (sgRNA und Cas9) in die Pflanze einzuführen. Dafür gibt es hauptsächlich zwei Möglichkeiten: die herkömmliche Technik und einen neuen Ansatz, der zurzeit für Pflanzensysteme entwickelt wird.

MÖGLICHKEIT 1
Stabile DNA-Integration/ Pflanzentransformation

Die durch das *Agrobacterium* vermittelte Pflanzentransformation ist eine weitverbreitete und effiziente Technik. *Agrobacterium tumefaciens* ist ein Bakterium, das Wucherungen in Pflanzen hervorruft, indem es ein kurzes DNA-Segment ins pflanzliche Genom einführt. Eine modifizierte, nicht pathogene Variante des Bakteriums wird verwendet, um Gene, die für das Genome Editing gebraucht werden, von einem Vektor ins Pflanzengenom einzuführen. Das funktioniert zum Beispiel, indem Blattstücke oder Blüten in einer Suspension von *Agrobacterium* getränkt werden. Der Vektor wird vom Bakterium in die Pflanzenzelle übertragen, die DNA in die pflanzliche DNA eingebaut und von der Zelle exprimiert. Somit sind alle nötigen Komponenten in der Zelle und das Genome Editing kann stattfinden.

Mit dieser Methode würde fremde DNA in die Tomatenzellen eingeführt werden, sie wären also transgen. Wenn eine Pflanze sich sexuell fortpflanzen kann (wie die Tomate), können Pflanzen erzeugt werden, die das editierte Gen, aber nicht die fremde DNA besitzen (1–4).

MÖGLICHKEIT 2
Ribonukleoproteine (RNP)

Eine neue Methode verwendet Ribonukleoproteine (RNP) statt DNA-Vektoren. Diese bestehen aus dem Cas9-Protein und der sgRNA und werden direkt in die Pflanze eingeführt. Sowohl Cas9 als auch die sgRNA können im Labor synthetisiert oder bei einer Firma bestellt werden. In der Pflanzenzelle werden Cas9 und die sgRNA (der RNP-Komplex) das ausgewählte Gen modifizieren und danach zerfallen. Mit dieser Methode wird keine fremde DNA ins Pflanzengenom integriert und die Pflanze ist nicht transgen.

FRAGEN

RNP werden in Säugetiersystemen häufig verwendet, es ist aber nicht so einfach sie in Pflanzen einzusetzen.

Warum denkst du, ist es so? Was ist der grösste Unterschied zwischen einer Säugetier- und einer Pflanzenzelle?

Um dieses Problem zu umgehen, versuchen Forschende Protoplasten zu benutzen (Zellen, bei denen die Zellwand entfernt wurde). Es ist zwar nicht schwierig Protoplasten zu erzeugen, aber aus diesen Zellen lassen sich sehr schwer neue Pflänzchen ziehen; dieses Problem der Regeneration beschäftigt Forschende schon seit Jahrzehnten. Trotz dieser Schwierigkeit werden Protoplasten intensiv erforscht, da sie den Vorteil haben Genome Editing zu ermöglichen, ohne dass fremde DNA ins Pflanzengenom integriert werden muss.

WISSEN

Einführen des Genome Editing-Werkzeugs in die Pflanze

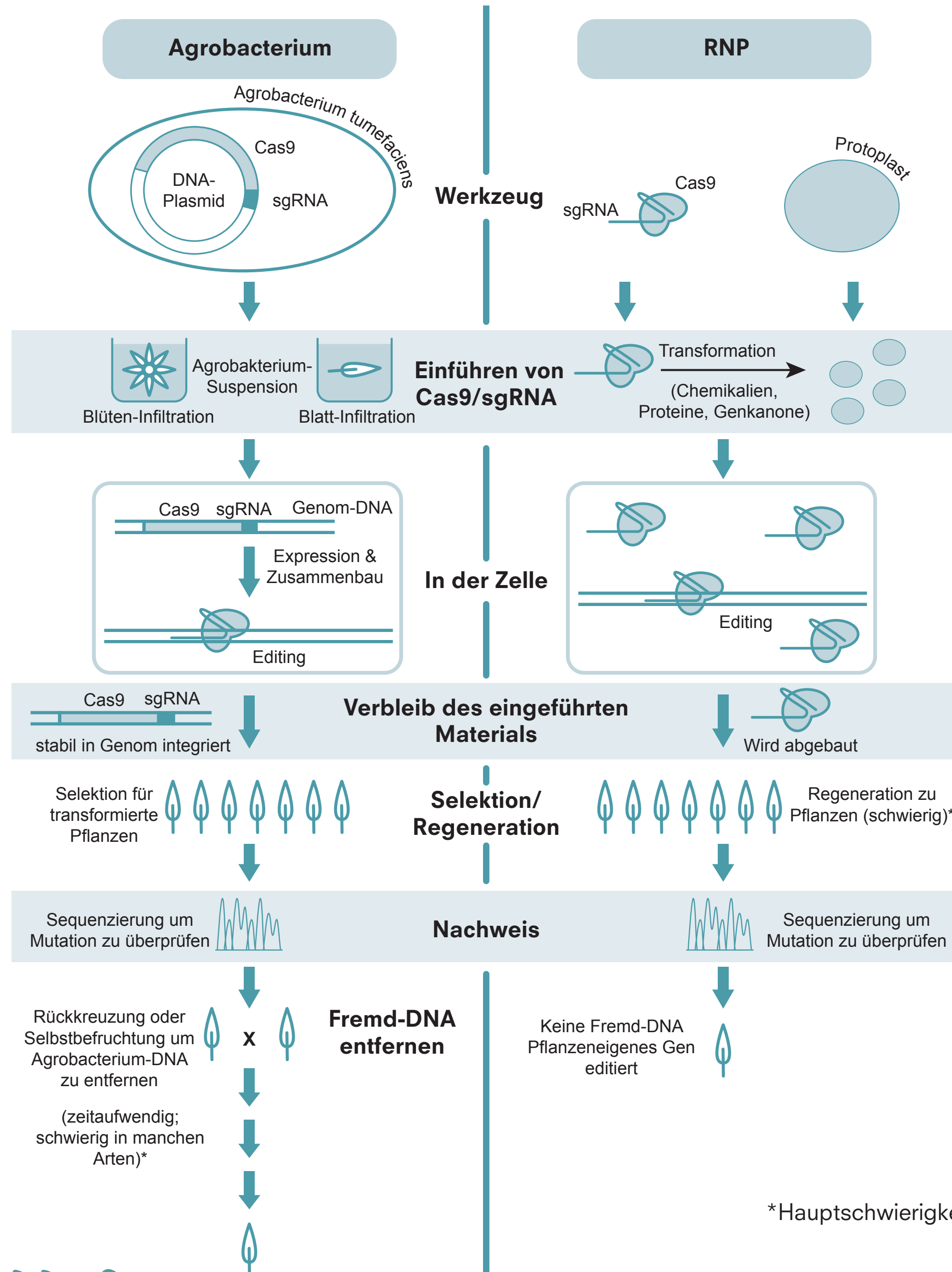


Abb. 9

Schematische Gegenüberstellung der zwei Methoden zum Einführen von Cas9/sgRNA in die Pflanzenzelle (nicht massstabgerecht) Transformation eines Plasmids mit dem *Agrobacterium tumefaciens vs*. Transformation von Ribonukleoproteinen (RNP) in Protoplasten (Pflanzenzellen, bei denen die Zellwand entfernt wurde). Bild: PSC

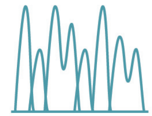
FRAGEN



Einführen des Genome Editing-Werkzeugs in die Pflanze

1. Was ist *Agrobacterium*? Wie wird es für die Verbesserung von Kulturpflanzen eingesetzt?

2. Was sind Protoplasten? Was ist ein Vorteil und was ein Nachteil in Bezug auf Genome Editing?



WISSEN

Nachweis der Genmodifizierung

Nachdem ein Genome Editing stattgefunden hat, ist der nächste Schritt — ähnlich wie in der konventionellen Zucht — die Pflanzen zu finden, die verbessert wurden. Bei einem erfolgreichen Genome Editing würde man die Verbesserung aus dem Phänotyp erkennen. Es würde aber Monate dauern, bis die Pflanze z. B. verbesserte Früchte tragen würde. Um Zeit und Ressourcen zu sparen, führt man deshalb den Nachweis der Genmodifizierung bereits im jugendlichen Gewebe mittels DNA-Sequenzierung durch: Die DNA an den Seiten der sgRNA-Zielsequenz wird mit PCR amplifiziert und sequenziert.

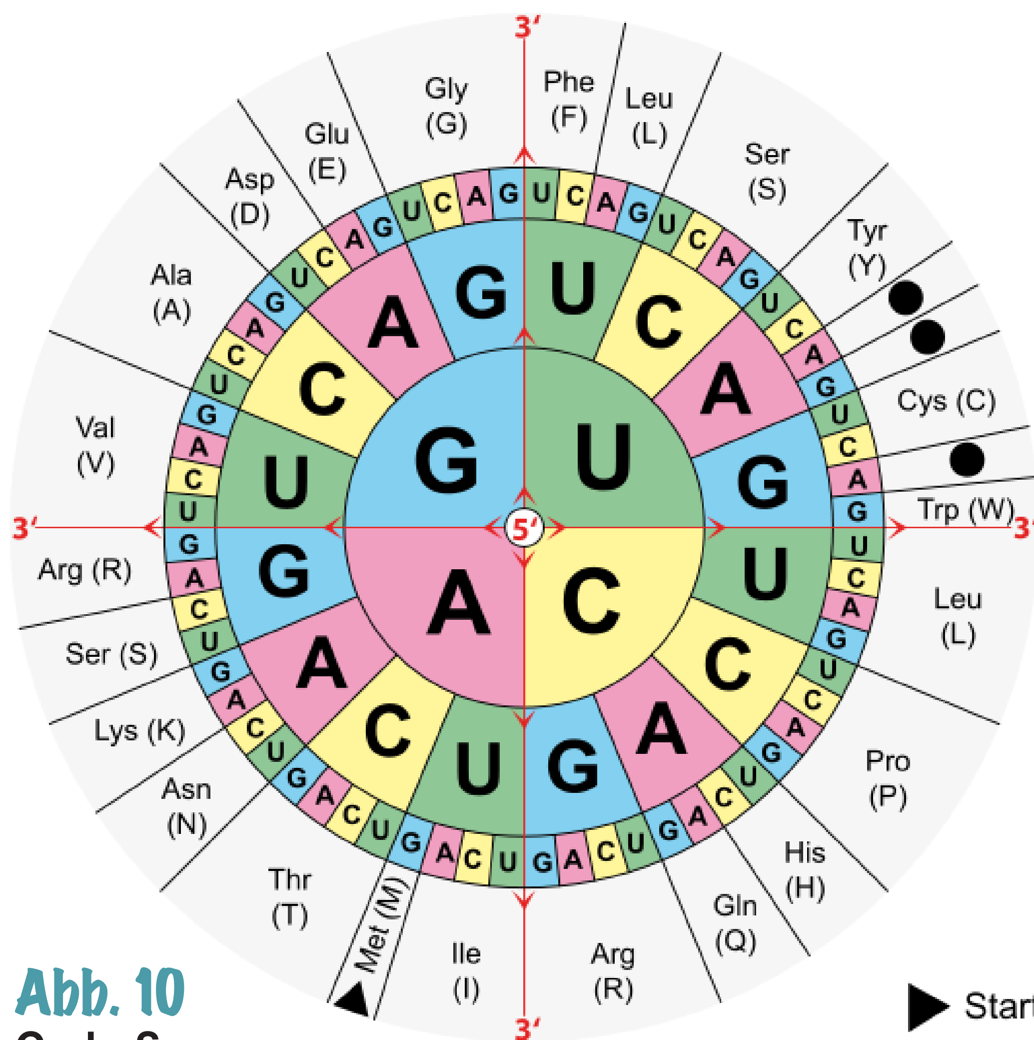
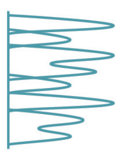


Abb. 10
Code-Sonne
Bild: Wikimedia Commons



AUFGABE

Nachweis der Genmodifizierung

sgRNA 3´ CUUAAAGACUUGGGUGUAGU 5´

Wildtyp

5´ ATGGATACTTTGTTGAAAACCCCAAATAACCTTGAATTTCTGAACCCACATCATGGTTTTGCTGTTAAAGCTAGTACC... 3´

M D T L L K T P N N L E F L N P H H G F A V K A S T ...

Pflanze 1, editiert

5´ ATGGATACTTTGTTGAAAACCCCAAATAACCTTGAATTTCTGAACTCATGGTTTTGCTGTTAAAGCTAGTAC... 3´

Pflanze 2, editiert

5´ ATGGATACTTTGTTGAAAACCCCAAATAACCTTGAATGGTTTTGCTGTTAAAGCTAGTAC... 3´

M D T L L K T P N N L E W F C C * S * Y ...

Pflanze 3, editiert

5´ ATGGATACTTTGTTGAAAACCCCAAATAACCTTGAATTTCTGAACCCTCATGGTTTTGCTGTTAAAGCTAGTACC... 3´

M D T L L K T P N N L E F L N P H G F A V K A S T ...

Pflanze 4, editiert

5´ ATGGATACTTTGTTGAAAACCCCAAATAACCTTGAATTTCTGAACCCACAGGTCATGGTTTTGCTGTTAAAGCTAGTACCT... 3´

M D T L L K T P N N L E F L N P Q V M V L L L K L V P ...

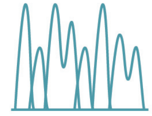
Pflanze 5, editiert

5´ ATGGATACTTTGTTGAAAACCCCAAATAACCTTGAATTTCTGAACCCATATCATGGTTTTGCTGTTAAAGCTAGTACC... 3´

M D T L L K T P N N L E F L N P Y H G F A V K A S T ...

Abb. 11
Sequenzen des Wildtyps und einiger editierter Pflanzen
Es ist jeweils der Nichtmatrizenstrang abgebildet. ATG: Startcodon; TGG: PAM

FRAGEN



Nachweis der Genmodifizierung

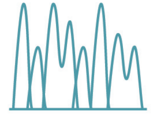
1. Pflanze 1: Verwende die Code-Sonne und übersetze die DNA-Sequenz direkt in die entsprechende Aminosäuresequenz. Da - wie im Laboralltag üblich - der Nichtmatrizenstrang abgebildet ist, entfällt bei der Übersetzung der Schritt über die mRNA. U kann mit T gleichgesetzt werden.

2. Pflanze 1: Wird diese Genmodifikation eine Änderung des Merkmals bewirken? Warum/warum nicht?

3. Was sind die Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen Pflanze 1 und Pflanze 2?

4. In Pflanze 3 wurden 3 Nukleotide entfernt.
Warum könnte es sein, dass diese Veränderung trotzdem keine Veränderung im Merkmal hervorruft?

FRAGEN (optional)



Nachweis der Genmodifizierung

1. Vergleiche Pflanze 4 und Pflanze 5.
   Welche Indels[Glossar] erkennst du? Was ist ein mögliches Problem in Pflanze 5?

2. Welche Pflanzen würdest du wählen, um sie weiter aufzuziehen?

3. Führt Genome Editing immer zu einer Inaktivierung des Gens? Wenn nicht, warum nicht?

REFLEXION

1. Wie unterscheiden sich Mutationszucht und Genome Editing voneinander?

2. Warum werden genomeditierte Pflanzen in manchen Ländern zu den genetisch modifizierten Pflanzen gezählt, in anderen Ländern nicht? Was ist deine Meinung?

RELEVANZ IN WISSENSCHAFT & GESELLSCHAFT

Genetische Vielfalt bei Kulturpflanzen

Individuen einer Art können sich genetisch voneinander unterscheiden. Je grösser diese genetische Vielfalt innerhalb einer Art ist, desto besser sind die langfristigen Überlebenschancen der Art. Die Pflanzen können sich besser an sich verändernde Umweltbedingungen anpassen oder haben mehr Chancen, sich gegen Krankheiten zu behaupten.

Die genetische Vielfalt bei Kulturpflanzen ist das Ergebnis jahrtausendlanger Bemühungen des Menschen. Aber wie lassen sich Wildpflanzen für den landwirtschaftlichen Anbau optimieren? Das braucht vor allem Zeit. Je nach Umweltbedingungen, geographischen Standorten, Anbaumethode oder Ernährungsgewohnheiten entwickeln Pflanzenzüchterinnen und Pflanzenzüchter neue Sorten. Im 20. Jahrhundert setzten sich Sorten durch, die auf Produktivität und Homogenität ausgelegt sind. Das hatte leider zur Folge, dass weniger ertragreiche Sorten nur noch selten angebaut wurden und in Vergessenheit geraten sind. Ein Rückgang der genetischen Vielfalt bei angebauten Sorten hat zur Folge, dass die Landwirtschaft weniger flexibel auf klimatische Veränderungen reagieren oder auf lokale Anbauanforderungen eingehen kann. Ausserdem bedeutet weniger Vielfalt beim Anbau auch weniger Vielfalt auf dem Teller. Eigenschaften wie ein guter Geschmack oder eine wertvollere Nährstoffzusammensetzung können auf der Strecke bleiben, wenn in der Zucht Selektionskriterien wie eine bessere Haltbarkeit oder gleichzeitige Fruchtreifung als wichtiger erachtet werden. Obwohl Genbanken[Glossar] für den Erhalt bereits bestehender Sorten sorgen, ist es ein Ziel der Pflanzenzüchterinnen und Pflanzenzüchter stets weitere Sorten zu entwickeln, die den sich verändernden Bedingungen und Ansprüchen gewachsen sind.

Moderne Pflanzenzucht

Die moderne Pflanzenzucht verlässt sich nicht mehr ausschliesslich auf den Zufall. Wurden in der Vergangenheit Pflanzen gekreuzt und über Generationen selektiert bis sich die gewünschte Kombination an Merkmalen in einer Pflanze manifestierte, wird heute zunehmend die Marker-gestützte Selektion (MAS) eingesetzt. Diese Art der Züchtung wird auch «SMART Breeding» oder Präzisionszucht genannt. Da bestimmte Eigenschaften auf bestimmte Gene zurückgeführt werden können, ermöglichen DNA-Tests, die für die Kreuzung geeignete Elternpflanzen zu identifizieren. Bereits im Keimlingsstadium können Pflanzenzüchterinnen und Pflanzenzüchter feststellen, ob das erwünschte Merkmal an die Nachkommen vererbt wurde. Diese Praxis verkürzt die Zeit zur Etablierung einer neuen Sorte erheblich. (Mehr zu SMART Breeding auch im PSC Discovery Workshop 3 «Moderne Pflanzenzucht».)

Gentechnik und Genome Editing

Sowohl die klassische Pflanzenzucht als auch die Präzisionszucht beruhen auf dem Kreuzen von Individuen, welche die erwünschten Merkmale bereits aufweisen bzw. die entsprechenden Gene enthalten. In der sogenannten Mutationszüchtung werden Chemikalien oder ionisierende Strahlung genutzt, um die natürliche Mutationsrate in der Pflanze zu erhöhen. Eine grössere Anzahl an Mutationen im Erbgut erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass eine erwünschte Veränderung in der Pflanze erzielt wird.

Mit Hilfe von Gentechnik können Pflanzenzüchterinnen und Pflanzenzüchter einer Kulturpflanze eine neue Eigenschaft geben, indem sie direkt das Erbgut verändern. Dabei kann zum Beispiel ein artfremdes Gen in die Pflanze transferiert werden – solche Pflanzen werden als transgen bezeichnet. Die Wahrscheinlichkeit, dass transgene Pflanzen auf natürlichem Wege entstehen, ist äusserst gering. Der Gentransfer geschieht meist mittels Genkanonen oder Bakterientransfektion und ist nicht gerichtet. Das bedeutet, dass nicht gesteuert werden kann, wo das fremde Gen ins Genom der Pflanze integriert wird.

Mit den Methoden des Genome Editing könnten diese Nachteile der klassischen Gentechnik (Einschleusen von Fremdgenen, ungerichtete Mutation) weitgehend vermieden werden. Bei diesen Verfahren wird eine bekannte DNA-Sequenz im Pflanzengenom gezielt verändert, ohne dass dabei fremde DNA eingeschleust werden muss. Die gängigsten Verfahren sind ZFN (Zinkfingernukleasen), TALEN (Transcription activator-like effector nuclease) und das CRISPR/Cas9-System. In allen drei Methoden wird zuerst die Zielsequenz im Genom präzise angesteuert, dann an der definierten Stelle geschnitten und zuletzt wird der herbeigeführte DNA-Doppelstrangbruch repariert. Dabei kann die Ziel-DNA nach Bedarf ausgeschaltet, verändert oder ersetzt werden. Das Einführen artfremder Gene wäre möglich, ist aber in der Pflanzenzucht weniger erwünscht, da dies die Zulassung einer Pflanze auf den Markt deutlich erschwert und von den Konsumenten weniger akzeptiert wird.

CRISPR/Cas9

Das CRISPR/Cas9-System hebt sich von den anderen Genome Editing-Methoden dadurch ab, dass es präziser, einfacher zu handhaben und günstiger ist. Es wird inzwischen in vielen Forschungsdisziplinen verwendet. Vor allem aufgrund seines Potentials in der Medizin ist CRISPR/Cas9 sehr präsent in den Medien. Aber auch in Pflanzen wird das System vermehrt eingesetzt. Mitte 2018 waren bereits 102 mittels CRISPR/Cas9 entwickelte Anwendungen bekannt. Dazu zählen kernlose Tomaten, Gluten-reduziertes Getreide oder Toleranz gegen Trockenheit bei Mais sowie ein besseres Wurzelwachstum bei Baumwolle (9).

GLOSSAR

Cas9
Cas9 ist ein bakterielles Protein, das mit RNA einen Komplex bilden, an DNA binden und diese schneiden kann. Es wird in der Molekularbiologie verwendet, um gezielt ausgewählte DNA-Sequenzen zu modifizieren (Genome Editing).

CRISPR
CRISPR ist die Abkürzung für Clustered Regulary InterSpaced Palindromic Repeats. Es handelt sich um DNA-Sequenzen, die im bakteriellen Genom wiederholt vorkommen und durch Abschnitte von Phagen-DNA (Spacer) unterbrochen werden. CRISPR und Spacer sind Teil einer Immunabwehr, die Bakterien gegen Bakteriophagen einsetzen. Das Bakterium integriert bei einer ersten Begegnung mit dem Phagen Teile der Phagen-DNA in sein eigenes Genom. Das ermöglicht dem Bakterium bei einer erneuten Infektion den Phagen zu erkennen und zu eliminieren.

Genbank
Etwa 1'750 Genbanken und botanische Gärten weltweit bewahren mehr als 7.4 Millionen Samen oder anderes pflanzliches Gewebe von Tausenden von Kulturpflanzen auf. Das Svalbard Global Seed Vault lagert Duplikate der nationalen Genbanken im Permafrost (2).

Hybride
Bei der Hybridzüchtung werden gezielt zwei - genetisch möglichst unterschiedliche - Inzuchtlinien gekreuzt. Inzuchtlinien sind homozygot. Das bedeutet, dass die homologen Chromosomen in diesen Pflanzen reinerbig sind. Die Nachkommen (F1-Generation) dieser Kreuzung werden Hybriden genannt. Sie sind leistungsfähiger und widerstandsfähiger als ihre Eltern. Dieses Phänomen wird auch Heterosis bzw. Heterosiseffekt genannt.

Indels
Insertionen und Deletionen von Nukleotiden werden als Indels zusammengefasst.

NHEJ
Die nicht-homologe Endverknüpfung (non-homologous end-joining) ist eine Methode, mit der Zellen Doppelstrangbrüche der DNA reparieren können. Sie fügen die abgeschnittenen Enden der DNA wieder zusammen, wobei aber Indels auftreten können. Wenn das in einem kodierenden Bereich passiert, kann es sein, dass das Gen seine Funktion verliert. senkt sich die Wahrscheinlichkeit, dass negative heterozygot rezessive Eigenschaften in den Nachkommen homozygot auftreten.

sgRNA
Singe Guide RNAs werden synthetisch hergestellt und zusammen mit Cas9 im Genome Editing verwendet. Sie bestehen aus zwei Abschnitten: Der erste Abschnitt ist komplementär zur DNA-Zielsequenz, die geschnitten werden soll. Der zweite Abschnitt bildet eine Schlaufe, die mit Cas9 verknüpft wird.

Sorte/Pflanzensorte
Als Pflanzensorten bezeichnet man Varianten einer Zier- oder Nutzpflanzenart. Die Sorte muss sich durch Merkmale wie Grösse, Farbe, Menge und Musterung von anderen Sorten der gleichen Art unterscheiden. Der analoge Begriff in der Tierzucht ist die Rasse.

REFERENZEN

1. Domestication and Breeding of Tomatoes: What have We Gained and What Can We Gain in the Future? Bai, Yuling und Lindhout, Pim. 2007, Annals of Botany, Bd. 100, S. 1085–1094.

2. The living library. Gruber, Karl. 2017, Nature, Bd. 544, S. 8–10.

3. Erhaltung der pflanzengenetischen Ressourcen. Bundesamt für Landwirtschaft. [Online] [abgerufen am 18.2.2019.] https://www.bdn.ch/lists/1328/content/.

4. The case of the FLAVR SAVR tomato. Bruening, G. und Lyons, J. M. 2000, California Agriculture, Bd. 54, S. 6–7.

5. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. The Tomato Genome Consortium. 2012, Nature, Bd. 485, S. 635-641.

6. De novo domestication of wild tomato using genome editing. Zsögön, Agustin, et al. 2018, Nat Biotechnol, Bd. 36, S. 1211–1216.

7. CHOPCHOP v2: a web tool for the next generation of CRISPR genome engineering. Labun, Kornel, et al. 2016, Nucleic Acids Research, Bd. 44, S. W272–W276.

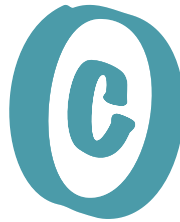
8. CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing. Montague, Tessa G., et al. 2014, Nucleic Acids Research, Bd. 42, S. W401–W407.

9. Aktualisierung der Übersicht über Nutz--und Zierpflanzen, die mittels neuer molekularbiologischer Techniken für die Bereiche Ernährung, Landwirtschaft und Gartenbau erzeugt wurden. Modrzejewski, Dominik, et al. https://www.bmel.de. [Online] 20.9.2018. [abgerufen am 4.3.2019.] https://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/Landwirtschaft/Pflanze/GrueneGentechnik/NMT_Stand-Regulierung_Anlage4-Aktualisierung.pdf?__blob=publicationFile.

Simon E. Bull
Pflanzenwissenschaftler

Q+A





Forschungsprojekte

Simon ist Pflanzenwissenschaftler in der Forschungsgruppe für Molekulare Pflanzenzucht an der ETH Zürich. Seine Forschungsarbeit richtet sich vor allem auf das Verstehen und Verbessern von Kulturpflanzen, um für Ernährungssicherheit und Diversifizierung für die Landwirtschaft zu sorgen. Simon hat erhebliche Erfahrung in der Erforschung von Maniok (Cassava) – einer wichtigen Hackfrucht, die im globalen Süden als Nahrung und für die Industrie angebaut wird. Ausserdem arbeitet Simon zurzeit daran, die Krankheitsresistenz von Apfelbäumen in der Schweiz zu verbessern.

Das Forschungsziel der Molekularen Pflanzenzucht ist es, genetische und genomische Werkzeuge zu entwickeln, welche die Pflanzenzucht verbessern und beschleunigen. Die Entwicklung neuer Sorten soll zu einer nachhaltigen Landwirtschaft beitragen.

Wie bist du zu deinem Forschungsgebiet gekommen?
Ich habe mich schon immer für Pflanzenbiologie interessiert und begann meine Karriere mit dem Erforschen von Pflanzenkrankheiten. In letzter Zeit interessiere ich mich vermehrt dafür, wie moderne Ansätze die Pflanzenzucht verbessern können.

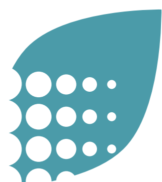
Was sind die wichtigsten Voraussetzungen für deinen Beruf?
Während einer wissenschaftlichen Karriere spezialisiert man sich in grossem Masse in einem Forschungsfeld. Das hilft, um Fachwissen aufzubauen, man muss aber immer im Blick behalten, wie die eigene Arbeit mit weiteren Forschungsfeldern zusammenpasst. Aufgeschlossenheit hilft, dass die eigene Forschung sich entwickelt und relevant bleibt.

Was sind die nächsten Herausforderungen?
Die grösste Herausforderung ist sicherzustellen, dass eine Vielfalt an Kulturpflanzen die Ernährung für kommende Generationen garantiert. Die Zucht von Kulturpflanzen und die Forschung brauchen Zeit, deshalb müssen wir bereits heute daran arbeiten, Pflanzen für die Zukunft zu entwickeln. Das bewerkstelligen wir sowohl über kontinuierliche Grundlagenforschung mit dem Ziel zu verstehen, wie Pflanzen wachsen, als auch über die Erweiterung unseres Werkzeugkastens für die Pflanzenzucht.

ZURICH-BASEL PLANT SCIENCE CENTER

Das Zurich-Basel Plant Science Center ist ein Kompetenzzentrum für Pflanzenwissenschaften an den drei Hochschulen ETH Zürich, Universität Zürich und Universität Basel. Es umfasst 37 Forschungsgruppen mit rund 600 Forschenden. Das Zentrum fördert sowohl Grundlagenforschung, wie auch angewandte Forschung in den vielseitigen Disziplinen der Pflanzenwissenschaften. Das Zurich-Basel Plant Science Center bietet ein breites Angebot an Workshops, Exkursionen und Freizeitaktivitäten für LehrerInnen, Familien, Schulklassen und interessierte Personen an, mit der Möglichkeit, Pflanzenforschung zu erleben und mit WissenschaftlerInnen vor Ort zu diskutieren.

Aktuelle Angebote finden Sie hier: plantsciences.uzh.ch/de/outreach



Danksagung
Die Entwicklung dieses PSC Discovery Workshops wurde unterstützt vom Bundesamt für Umwelt.

Dr. Thomas Städler (Institut für Integrative Biologie, ETH Zürich) für Rat bzgl. *Solanum lycopersicum*.

David Stähli (Molekulare Pflanzenzüchtung, ETH Zürich) für das Gegenlesen des Manuskripts.

Partner
ETH MINT Lernzentrum

Copyright
© Zurich-Basel Plant Science Center
PSC Discovery Workshops: Genome Editing, 2019

Die Inhalte des Forschungshefts sind unter CC BY-NC-SA 2.5 CH (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/ch) frei verfügbar.

Zitiervorschlag
Rosakis, A., Bull, S. E., Schürmann-Kälin, I., Dahinden, M. (2019). PSC Discovery Workshops: Forschungsheft#8 Genome Editing. Zurich: Zurich-Basel Plant Science Center. ISBN: 978-3-906916-53-8
https://doi.org/10.3929/ethz-b-000366987

Herausgeberin
Zurich-Basel Plant Science Center
Geschäftsstelle, ETH Zürich, TAN D 5.2
Tannenstrasse 1
8092 Zürich
Schweiz
+41 44 632 23 33
info-plantscience@ethz.ch
www.plantsciences.ch

AutorInnen
Alexandra Rosakis, Simon E. Bull, Irene Schürmann-Kälin, Manuela Dahinden

Layout & Illustration
fabianleuenberger.com und Alexandra Rosakis

PDF-Download
https://doi.org/10.3929/ethz-b-000366987

Version 8.4. — 2019-06-05